

DY

XP-002277064

AN - 1998-075292 [07]

AP - SU19884495987 19881019

CPY - BIOO-R

DC - A89 E35 J01 L01

DR - 1694-P

FS - CPI

IC - B01D15/08

IN - SABUROV V V; TURKIN S I; ZUBOV V P

MC - A12-L04A E31-P01 J01-D01A L01-G

M3 - [01] B114 B702 B720 B831 C108 C800 C802 C803 C804 C805 C807 M411 M424
M720 M740 M903 M904 M910 N104 N141 N513 N524 Q452; R01694-P; 1694-P

PA - (BIOO-R) BIOORGANIC CHEM INST

PN - RU2080905 C1 19970610 DW199807 B01D15/08 004pp

PR - SU19884495987 19881019

XA - C1998-025040

XIC - B01D-015/08

AB - RU2080905 The modified macroporous silica production for chromatography of biopolymers including: treatment of silica sorbent with pore diameters of 6 to 400 nm by a monomer which contains fluorine while irradiating with gamma radiation as a silica sorbent uses silica treated with vinyl methyl dichlorosilane in a medium of organic solvent while heating. The sorbent exposed to vacuum is activated by a source of gamma-radiation and treatment is by trifluorostyrene from the gas phase.

- USE - For modified macroporous silica production which is applied in chromatography.

- ADVANTAGE - Reduces non-specific sorption of tRNA from aqueous solutions on modified silica.

- (Dwg.0/0)

CN - R01694-P

DRL - 1694-P

IW - MODIFIED MACROPOROUS SILICA PRODUCE BIO POLYMER CHROMATOGRAPHY TREAT SILICA SORPTION VINYL METHYL DI CHLORO SILANE INORGANIC SOLVENT IRRADIATE GAMMA RADIATE GAS TRI FLUORO STYRENE

IKW - MODIFIED MACROPOROUS SILICA PRODUCE BIO POLYMER CHROMATOGRAPHY TREAT SILICA SORPTION VINYL METHYL DI CHLORO SILANE INORGANIC SOLVENT IRRADIATE GAMMA RADIATE GAS TRI FLUORO STYRENE

INW - SABUROV V V; TURKIN S I; ZUBOV V P

NC - 001

OPD - 1988-10-19

ORD - 1997-06-10

PAW - (BIOO-R) BIOORGANIC CHEM INST

TI - Modified macroporous silica production for bio-polymer chromatography
- by treating silica sorbent with vinyl:methyl:di:chloro:silane
inorganic solvent while irradiating with gamma-radiation and gaseous
tri:fluoro-styrene

A01 - [001] 018 ; G0226 G0204 G0102 G0022 D01 D12 D10 D18 D51 D53 D69 7A
D59 D88 F- ; H0000 ; L9999 L2506-R ; L9999 L2299 ; P1741 ;
- [002] 018 ; ND01 ; Q9999 Q7807 Q7794 ; N9999 N7158 N7034 N7023 ;
N9999 N7147 N7034 N7023 ; K9676-R ; K9483-R ; K9336 K9803 K9790 ;
K9949 ; K9529 K9483 ; Q9999 Q7114-R ; B9999 B5094 B4977 B4740 ;



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 080 905⁽¹³⁾ C1
(51) МПК⁶ B 01 D 15/08

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4495987/25, 19.10.1988

(46) Дата публикации: 10.06.1997

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N
687081, кл. С 08 F 8/32, 1977.

(71) Заявитель:
Институт биоорганической химии
им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

(72) Изобретатель: Сабуров В.В.,
Зубов В.П., Туркин С.И., Киселев
Е.М., Димитриев К.Н., Царькова М.С.

(73) Патентообладатель:
Институт биоорганической химии
им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО МАКРОПОРИСТОГО КРЕМНЕЗЕМА ДЛЯ
ХРОМАТОГРАФИИ БИОПОЛИМЕРОВ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к получению
микропористого кремнезема для
хроматографии биополимеров. Кремнезем с
диаметром пор 6 - 400 нм, обработанный
винилметилхлорсиланом в среде

органического растворителя, вакуумируют,
активируют источником γ -облучения и
обрабатывают парами трифторметида. Полученный
сорбент позволяет снизить неспецифическую сорбцию РНК из водных
растворов. 2 табл.

RU 2 080 905 C1

RU 2 080 905 C1



(19) RU (11) 2 080 905 (13) C1
(51) Int. Cl. 6 B 01 D 15/08

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 4495987/25., 19.10.1988

(46) Date of publication: 10.06.1997

(71) Applicant:
Institut bioorganicheskoy khimii
im.M.M.Shemjakina i Ju.A.Ovchinnikova RAN

(72) Inventor: Saburov V.V.,
Zubov V.P., Turkin S.I., Kiselev E.M., Dimitriev
K.N., Tsar'kova M.S.

(73) Proprietor:
Institut bioorganicheskoy khimii
im.M.M.Shemjakina i Ju.A.Ovchinnikova RAN

(54) METHOD OF PREPARING MODIFIED MACROPOROUS SILICA FOR CHROMATOGRAPHY OF
BIOPOLYMERS

(57) Abstract:

FIELD: production OF chromatographic materials. SUBSTANCE: silica with pore diameter 6-400 nm treated with vinylmethylchlorosilane in organic solvent medium is evacuated, activated

with γ -radiation source, and treated with trifluorostyrene vapor. Resultant sorbent has reduced capability of nonspecific sorption of ribonucleic acids from aqueous solutions. EFFECT: increased selectivity of sorbent. 2 tbl

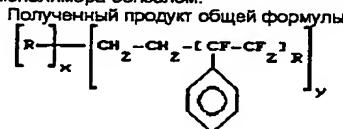
RU 2 080 905 C1

R U
2 0 8 0 9 0 5
C 1

Изобретение относится к твердым сорбентам для жидкостной хроматографии и может быть использовано в обращенно-фазовой хроматографии нуклеиновых кислот и пептидов.

Цель изобретения - снижение неспецифической сорбции tРНК из водных растворов на модифицированном кремнеземе.

Пример 1. 10 г высушенного при 573 К макропористого стекла (МПС-2000ГХ) кипятят в 5% растворе метилвинилхлорсилана в абсолютном толуоле в течение 10 часов. После этого МПС промывают абсолютным бензолом, ацетоном и сушат вначале в вакуумном шкафу, в затем на вакуумной установке при 10^{-3} Торр до постоянного веса. Перед облучением МПС вакуумируют при 413 К до остаточного давления 10^{-3} Торр и облучают с помощью источника γ облучения дозой 5 Мрад при 77 К. Ампулу размораживают до комнатной температуры, напускают пары трифтормстирола и выдерживают в течение 8 часов. После этого образец откачивают до 10^{-3} Торр, напускают воздух и отсоединяют от установки. Модифицированный кремнезем помещают в аппарат Сокслетта и в течение 3 часов проводят экстракцию образовавшегося гомополимера бензолом.



при гравиметрическом анализе дает значение X 95 мас. Y 5 мас. при анализе на углерод 3,2% на фтор 1,5% что соответствует значениям X 95 мас. Y 5 мас. Молекулярный вес полиглиптрафтилорила определяли методом экспозиционной ВЭЖХ после растворения модифицированного кремнезема в 30% плавиковой кислоте и экстракции полимера тетрагидрофураном.

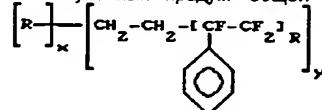
Значения N составили 550 600.

Пример 2. Синтез проводят аналогично примеру 1, только вместо МПС-2000 берут МПС-250, а облучают дозой 8 Мрад. Полученный продукт при гравиметрическом анализе дает значения X 85 мас. Y 15 мас. при анализе на углерод 9,7% на фтор 4,5% что соответствует значениям X 85 мас. Y 15 мас. Значения N составили 450 550.

Пример 3. Получение сорбента для высокоэффективной хроматографии. 10 г высушенного при 573 К силикагеля с диаметром пор 50 нм (фракция 10 мкм) кипятят в 5% растворе метилвинилхлорсилана в абсолютном толуоле в течение 10 часов. После этого силикагель промывают абсолютным бензолом, ацетоном и сушат вначале в вакуумном шкафу, в затем на вакуумной установке при 10^{-3} Торр до постоянного веса. Перед облучением силикагель вакуумируют при 413 К до остаточного давления 10^{-3} Торр и облучают с помощью источника γ облучения дозой 1 Мрад при 77 К. Ампулу размораживают до комнатной температуры, напускают пары трифтормстирола и выдерживают в течение суток. После этого образец откачивают до 10^{-3} Торр, напускают

воздух и отсоединяют от установки. Модифицированный кремнезем помещают в аппарат Сокслетта и в течение 8 часов проводят экстракцию образовавшегося гомополимера бензолом.

Полученный продукт общей формулы



при гравиметрическом анализе дает значения X 85 мас. Y 15 мас. при анализе на углерод 9,0% на фтор 4,3% что соответствует значениям X 86 мас. Y 14 мас. Значения N составили 300 450.

Пример 4. Синтез сорбента ведут как в примере 3, но в качестве исходного кремнезема берут силикагель Армсфер Сил30 (диаметр пор 30 нм), а облучают дозой 5 Мрад. Анализ продукта на углерод дает значение 12,9% на фтор 6,1% что соответствует значениям X 80 мас. Y 20 мас.

Пример 5. Синтез сорбента ведут как в примере 3, но в качестве исходного кремнезема берут силикагель Армсфер Сил=10 (диаметр пор 10 нм), а облучают дозой 8 Мрад. Анализ продукта на углерод дает значение 19,3% на фтор 9,2% что соответствует значениям X 70 мас. Y 30 мас.

Пример 6. Адсорбционную емкость сорбентов, синтезированных по примерам 3-6, определяют по толуолу. Полученные данные приведены в табл.1. Как видно из таблицы, емкость всех сорбентов высокая, что позволяет их использовать в обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 7. Стальную колонку размером 4,6x250 мм заполняют сорбентом, приготовленным по примерам 3-5 и определяют ее эффективность по бифенилу, используя элюент метанол-вода (85-15). Результаты представлены в табл.1. Эффективность составляет 30 45 тыс. т.т. на метр длины.

Сорбент применяют либо для избирательной фиксации биологических макромолекул, которые желательно выделить или очистить, либо для избирательного задерживания примесей (обычно высокомолекулярных нуклеиновых кислот и белков), присутствие которых является нежелательным. Избирательная фиксация биополимеров легко может быть достигнута путем регулирования величины полярности и гидрофобности элюента в соответствии с хорошо известными методами, применяемыми в обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии. В том случае, когда сорбируются макромолекулы, которые необходимо очистить, их элюируют раствором, содержащим определенное количество органической добавки. В том случае, если материал задерживает примеси, биополимеры собирают непосредственно в растворе, после чего проводят регенерацию сорбента для последующего использования. Нижеследующий пример подтверждает эффективность применения сорбента для очистки нуклеиновых кислот.

Пример 8. Проводят высокоэффективную очистку нуклеиновых кислот от белков, используя 500 мг сорбента, приготовленного по примерам 1-2, по следующей схеме:

сначала приводят колонку в состояние равновесия с 0,01М ТЕ-буфером (рН= 8,1). Затем в шприц объемом 5 мл набирают порцию плазмиды (или любой другой нуклеиновой кислоты) и медленно продавливают через колонку. Элюят повторно набирают в шприц и продавливают через колонку. Так повторяют 5-9 раз. За один цикл можно почистить от 20 до 30 мг нуклеиновой кислоты. Колонку регенерируют промывкой метанолом с этиленгликолем (5:1).

Сорбенты, полученные по примерам 3-5, используют для обращенно-фазовой ВЭЖХ пептидов. Это применение поясняется следующим примером.

Пример 9. Проводят разделение пептидов на колонке (2 x 65 мм) заполненной сорбентом, полученным по примеру 3. Элюцию ведут градиентом концентрации (0-50%) ацетонитрила в 0,1% трифтормукусной кислоте общим объемом 2400 мкл со скоростью 100 мкл/мин. Порядок выхода пептидов: А-цепь инсулина, брадикинин, Б-цепь инсулина, лизоцим. Эффективность колонки по лизоциму, определенная в изократическом режиме при постоянной концентрации ацетонитрила, равной 50% составила 30 тыс. т.т./м.

Пример 10. Для определения неспецифической сорбции tРНК 1 г сорбента, полученного по примерам 1-2, прибавляют в 5 мл пропилового спирта, дегазируют под вакуумом. Затем спирт декантируют, сорбент

промывают 0,01 М трис-НС1 буфером (рН=7,5) и помещают в колонку размером 1 x 6 см. На колонку наносят 1 мг tРНК E.coli в 0,5 мл указанного буферного раствора и элюируют со скоростью 0,5 мл/мин общим объемом 10 мл. Собирают 10 мл элюата и спектрофотометрически определяют концентрацию tРНК. Умножая концентрацию на объем элюата (10 мл), получают содержание tРНК в элюате. Разность между исходным количеством tРНК и содержанием ее в элюате представляет собой величину неспецифической сорбции tРНК на сорбенте, синтезированном по предлагаемому способу. Полученные результаты представлены в табл.2.

Формула изобретения:
Способ получения модифицированного макропористого кремнезема для хроматографии биополимеров, включающий обработку кремнеземного сорбента с диаметром пор 6-400 нм фторсодержащим мономером под действием гамма-облучения, отличающийся тем, что, с целью снижения неспецифической сорбции tРНК из водных растворов, в качестве кремнеземного сорбента используют кремнезем, обработанный винилметилдихлорсиланом в среде органического растворителя при нагревании, вакуумированный сорбент активируют источником Ј-облучения, а обработку ведут трифторметилем из газовой фазы.

Т а б л и ц а 1

Сорбент (№ примера)	Емкость сорбента* по толуолу (мг/г)	Эффективность колонки (тыс.т.т./м)
3	3,3	30
4	7,5	38
5	14,7	45
прототип	0,1	8,8

* элюент метанол-вода (85:15), скорость элюента 0,8 мл/мин.

Т а б л и ц а 2

Величины неспецифической сорбции тРНК на сорбентах по примерам 1-2 и на сорбенте-прототипе

№ примера	неспецифическая сорбция тРНК, мг/г
1	0,04
2	0,08
сорбент по прототипу (пример 1)	0,95

RU 2080905 C1

RU 2080905 C1